飞蝗细胞色素 P450 基因 *LmCYP6FD3* 的表达及其在杀虫剂解毒中的作用

朱文雅[1,2,3,4], 吴海花[1,2,4], 张学尧[1,2,4], 刘 娇[1,2,4],
张建珍[1,2,4,*], 马恩波[1,2,4,*]

(1. 山西大学应用生物学研究所, 太原 030006; 2. 山西大学生命科学学院, 太原 030006;
3. 山西省农业科学院植物保护研究所, 太原 030031; 4. 农业有害生物综合治理山西省重点实验室, 太原 030031)

摘要:【目的】研究飞蝗 *Locusta migratoria* 细胞色素 P450 基因的分子特性和生物学功能。【方法】搜索飞蝗转录组数据库,获得细胞色素 P450 基因 cDNA 序列,采用 RT-PCR 技术克隆目的基因 cDNA 全长序列。采用实时定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)技术测定其在飞蝗 5 龄若虫不同组织(胃盲囊、前肠、中肠、后肠、体壁、精巢、卵巢、肌肉、血淋巴、脂肪体和马氏管)中及不同发育阶段(卵、1 –5 龄若虫及成虫)的表达水平。采用 RNA 干扰(RNAi)技术沉默飞蝗 2 龄若虫细胞色素 P450 基因,检测基因的沉默效率,并研究该基因干扰后,2 龄若虫对杀虫剂马拉硫磷、西维因和溴氰菊酯 3 种杀虫剂的敏感性。【结果】克隆获得飞蝗细胞色素 P450 基因的 cDNA 全长序列(GenBank 登录号: KT316378),将其命名为 *LmCYP6FD3*, 其核苷酸序列全长为 1 563 bp,编码 521 个氨基酸。研究发现该基因在飞蝗 5 龄若虫马氏管中高表达,其次是后肠和脂肪体中,在其他组织中的表达量相对较低;对 *LmCYP6FD3* 在飞蝗不同发育阶段的表达进行检测,发现该基因在飞蝗整个发育阶段均有表达,在若虫期表达量较高。RNA 干扰结合杀虫剂生物测定结果表明, *LmCYP6FD3* 在 RNA 干扰 24 h 时的沉默效率最高;2 龄若虫点滴接触西维因,RNAi 处理组(ds*LmCYP6FD3* 注射组)与对照组(ds*GFP* 注射组)相比,死亡率提高了 32%。【结论】克隆获得飞蝗 *LmCYP6FD3* 的 cDNA 全长序列,该基因在飞蝗马氏管中高表达,并可能参与西维因在飞蝗体内的解毒代谢。

关键词: 细胞色素 P450; 飞蝗; 基因表达; RNA 干扰; 杀虫剂

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2017)07-0742-08

Expression profiles of the cytochrome P450 gene *LmCYP6FD3* in *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) and its role in insecticide detoxification

ZHU Wen-Ya[1,2,3,4], WU Hai-Hua[1,2,4], ZHANG Xue-Yao[1,2,4], LIU Jiao[1,2,4], ZHANG Jian-Zhen[1,2,4,*], MA En-Bo[1,2,4,*] (1. Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Institute of Plant Protection, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China; 4. Key Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture, Taiyuan 030031, China)

Abstract:【Aim】To study the molecular characterization and biological function of the cytochrome P450 gene *LmCYP6FD3* from the migratory locust, *Locusta migratoria*.【Methods】The cytochrome P450 gene sequences were searched from the transcriptome database of *L. migratoria*, the cDNA fragment of the target gene was cloned using RT-PCR, and its expression patterns in various tissues (gastric caeca,

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目(31320103921); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31101463); 山西省自然科学基金项目(201601D011073)

作者简介: 朱文雅, 女, 山西太原人, 博士研究生, 研究方向动物生物化学与分子生物学, E-mail: zhuwenya1981@126.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: maenbo2003@sxu.edu.cn; zjz@sxu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-04-02; 接受日期 Accepted: 2017-06-12

foregut, midgut, hindgut, integument, testis, ovary, muscles, hemolymph, fat body and Malpighian tubules) of the 5th instar nymphs and different developmental stages (egg, 1st – 5th instar nymph and adult) were analyzed using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The target gene was silenced by RNA interference (RNAi), the silence efficiency was evaluated by injecting dsRNA to the 2nd instar nymphs, and the susceptibility of the nymphs to three insecticides (malathion, carbaryl and deltamethrin) was assessed. 【Results】The full-length cDNA of cytochrome P450 gene was cloned (GenBank accession no.: KT316378) and named *LmCYP6FD3*. Its length is 1 563 bp, encoding 521 amino acids. The expression level of *LmCYP6FD3* was the highest in the Malpighian tubules of the 5th instar nymphs, moderate in the hindgut and fat body, and lower in other tissues. *LmCYP6FD3* was expressed during the whole developmental period and had relatively higher expression level in the nymphal stage. Insecticide bioassay in combination with RNAi showed that the highest silence efficiency of *LmCYP6FD3* was achieved at 24 h after RNAi, and the mortality of the 2nd instar nymphs of *L. migratoria* in the RNAi treatment group (injection with ds*LmCYP6FD3*) increased by 32% as compared with that of the control group (injection with ds*GFP*) after exposure to carbaryl by dipping method. 【Conclusion】In this study, the full-length of cDNA sequence of *LmCYP6FD3* was cloned. This gene has the highest expression level in the Malpighian tubules of *L. migratoria* and might play a significant role in the detoxification of carbaryl in this locust.

Key words: Cytochrome P450; *Locusta migratoria*; gene expression; RNA interference; insecticide

飞蝗 *Locusta migratoria* 是一种世界性农业害虫,具有极强的迁飞性和暴发性,主要为害禾本科植物,对农业生产造成巨大损失(任炳忠和张雪, 2013)。目前,化学防治是蝗灾的主要防控方法,而化学杀虫剂的长期使用,不仅破坏生态环境,威胁人类健康和食品安全,而且导致田间飞蝗种群对杀虫剂产生了抗药性(Yang *et al*., 2008)。因此,测定飞蝗对不同类型杀虫剂的敏感性,对进一步筛选杀虫剂新靶标,研发环境友好型杀虫剂具有重要意义。飞蝗对杀虫剂产生抗药性的主要机制之一是酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶和细胞色素 P450 等解毒酶活力的增强(He *et al*., 2004; Yang *et al*., 2009)。细胞色素 P450 是由多个基因家族组成的基因超家族,几乎存在于所有生物体内(Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000)。目前,已报道的昆虫 P450 基因家族多达 60 余个,其中包括 CYP4, CYP6, CYP9, CYP12, CYP18, CYP28, CYP49, CYP300s 和 CYP400s 基因家族等(Fogleman and Danielson, 2000)。P450 基因参与昆虫的生长发育过程,包括蜕皮激素和保幼激素等内源物质的生物合成,以及植物次生物质和杀虫剂等外源物质的代谢(Feyereisen, 1999; David *et al*., 2003; Baldwin *et al*., 2009)。其中,CYP6 家族与外源物质的代谢相关,研究显示,细胞色素 P450 基因 *CYP6B1* 参与了呋喃香豆素在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 体内的代谢(Cohen *et al*., 1992);*CYP6BG1* 在小菜蛾 *Plutella xylostella* 苄氯菊酯抗性品系中过量表达,通过 RNAi 技术研究表明,该基因参与苄氯菊酯的代谢,导致小菜蛾抗药性的产生(Bautista *et al*., 2009)。笔者实验室前期已利用 RNAi 技术结合生物测定,发现飞蝗细胞色素 P450 基因 *LmCYP408B1* 和 *LmCYP409A1* 与拟除虫菊酯类杀虫剂溴氰菊酯在飞蝗体内的解毒过程有一定相关性(Guo *et al*., 2012)。而飞蝗细胞色素 P450 基因对其他不同类型杀虫剂的解毒功能还有待深入研究。

本研究基于飞蝗转录组数据库,克隆得到隶属于 CYP6 家族的细胞色素 P450 基因,测定了其在飞蝗不同组织中及不同发育阶段的表达特性,并采用 RNA 干扰技术,研究其对马拉硫磷、西维因和溴氰菊酯 3 种常用杀虫剂的解毒特性,探究其在杀虫剂解毒过程中的作用,以期为进一步筛选杀虫剂新靶标,研发环境友好型杀虫剂提供基础资料。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

飞蝗卵购于河北沧州,并置于人工气候箱中孵化和饲养,温度 28 ± 1℃,相对湿度50%±5%,光周期 14L∶10D。孵化的蝗蝻以小麦 *Triticum aestivum*(品种为轮选 987)新鲜麦苗饲喂。

1.2　供试试剂

总 RNA 提取试剂 RNAiso™ Plus 购于 TaKaRa

公司,氯仿、异戊醇均为国产分析醇;cDNA 第 1 链合成试剂 Reverse Transcriptase 购于 Fermentas 公司,dNTP Mix 和 RNAase Inhibitor 购于 TaKaRa 公司,*Trans*1-T1 感受态细胞和 pEASY-T3 载体购于全式金公司, qPCR 试剂 SYBR Green Real-time quantitative PCR (RT-qRCR) MasterMix 购于 TOYOBO 公司, RNAi 试剂 T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒购于 Promega 公司,杀虫剂马拉硫磷和溴氰菊酯购于 Sigma 公司,西维因购于 Chemical Service 公司。

1.3 引物设计

根据飞蝗转录组数据库搜索获得的细胞色素 P450 基因核苷酸序列,经过 BlastX 分析后,采用 Primer5.0 软件设计全长验证引物,Real-time qPCR 引物以及 dsRNA 合成引物(表 1)由上海生工生物有限公司合成。

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Information of primers used in this study

基因 Gene name	序列(5′-3′) Primer sequence	产物大小(bp) Product size	引物用途 Purpose
LmCYP6FD3	F: ACCGAGAGAATGCTGTCGGACTACTG R: TCCAACCAACGGCGTAAAAAATAATA	1 563	cDNA 克隆 cDNA cloning
LmCYP6FD3	F: ATGTCGTTCTGGAGAAGGGAA R: GCAGGTAGACGTATGGGTGGC	147	实时定量 PCR Real-time quantitative PCR
β-actin	F: CGAAGCACAGTCAAAGAGAGGTA R: GCTTCAGTCAAGAGAACAGGATG	156	
LmCYP6FD3	F: taatacgactcactatagggGATCTTCGATCCGACCTTCA R: taatacgactcactatagggTCGAGGTAGGTCATTTTGGC	486	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
GFP	F: taatacgactcactatagggGTGGAGAGGGTGAAGG R: taatacgactcactatagggGGGCAGATTGTGTGGAC	712	

小写字母表示 T7 启动子序列。Lowercase letters stand for T7 promoter sequence.

1.4 飞蝗细胞色素 P450 基因 cDNA 全长序列克隆及序列分析

参照本实验室之前的方法(任晓宇等, 2014),获得飞蝗 5 龄若虫基因组 cDNA 第 1 链,以其为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL,浓度为 10 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μL,浓度为 0.0299 μg/μL 的 cDNA 模板 1 μL, H_2O 10.5 μL。扩增条件: 94℃ 1 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。依照本实验室之前的方法(任晓宇等, 2014)对 PCR 产物进行纯化后,克隆至 pEASY-T3 载体,并由华大公司进行测序验证。

1.5 飞蝗细胞色素 P450 基因在飞蝗不同发育阶段与不同组织中的表达分析

选取飞蝗卵、1-5 龄若虫及成虫提取 RNA。卵期、若虫每个龄期及成虫期均设置 3 个生物学重复,其中每个生物学重复 15 粒卵、每龄期若虫各 10 头及羽化后第 3 天活力良好的飞蝗成虫 10 头(5 雌 5 雄),将上述虫体材料冻存于 -80℃ 低温冰箱中备用。cDNA 模板的制备方法同 1.4 节。解剖 5 龄第 2-3 天飞蝗若虫前肠、胃盲囊、中肠、后肠、马氏管、脂肪体、体壁、精巢、卵巢、肌肉和血淋巴共 11 个组织,每个组织 3 个生物学重复,每个生物学重复分别解剖雌雄虫各 5 头。cDNA 模板的制备方法同 1.4 节。采用 RT-qRCR 方法分析飞蝗细胞色素 P450 基因在飞蝗不同发育阶段和不同组织中 mRNA 的相对表达量,以 *β-actin* 作为内参基因 (Liu *et al*., 2013)。采用荧光染料 SYBR Green 经实时定量 PCR 仪(ABI 公司 7300 型)进行检测。20 μL 反应体系: SYBR Green Real-time PCR MasterMix 10 μL,浓度为 10 μmol/L 的上下游引物各 0.8 μL,经过 40 倍稀释的 cDNA 模板 4 μL, ddH_2O 4.4 μL。反应程序: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 31 s,共 40 个循环。熔解曲线由仪器自动生成,飞蝗细胞色素 P450 基因在不同发育阶段和不同组织中的相对表达量使用双标准曲线法 (Qin *et al*., 2011)进行分析。

1.6 飞蝗细胞色素 P450 基因的沉默及效率检测

飞蝗细胞色素 P450 基因 dsRNA 的体外合成参照 T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒说明书进行,用 1.5% 的琼脂糖凝胶对合成的 dsRNA 进行电泳检测,使用 NaNoDrop2000(Thermo Scientific)定量。

使用微量注射器将飞蝗细胞色素 P450 基因 dsRNA 3 μg 沿第 2-3 腹节节间膜处注射入 2 龄第

3 天活力良好的飞蝗若虫体内，对照组注射等量的 ds*GFP*，实验设计 3 个生物学重复，每个重复 30 头若虫。分别在 12，24 和 48 h 后收虫，每个时间点收取虫体各 9 头，3 头为一个生物学重复，共 3 个生物学重复，用于 RT-qPCR 检测不同时间点 RNA 的沉默效率。反应体系：ddH_2O 4.4 μL，SYBR Green Real-time PCR MasterMix 10 μL，浓度为 10 μmol/L 的上下游引物各 0.8 μL，稀释 40 倍的 cDNA 模板 4 μL。反应程序：95℃ 预变性 30 s；95℃ 5 s，60℃ 31 s，共 40 个循环。

1.7　RNA 干扰后飞蝗对 3 种不同类型杀虫剂的敏感性分析

挑选 2 龄第 3 天活力良好的飞蝗若虫，注射 3 μg 飞蝗细胞色素 P450 基因 dsRNA，对照组注射 ds*GFP*，每组注射 33～45 头虫体，24 h 后点滴 3 μL 杀虫剂，24 h 后，统计死亡率。共设 3 个生物学重复，每个生物学重复 11～15 头虫体。每种杀虫剂的剂量选择均依据其 LD_{30} 值，浓度分别为马拉硫磷 70 mg/L、西维因 12 mg/L、溴氰菊酯 0.4 mg/L。

1.8　数据统计分析

实时荧光定量 PCR 结果采用比较 C_T 值相对定量法（$2^{-\triangle\triangle C_T}$法）计算目的基因的相对表达量，将表达量最低的样品数值视为 1，其他样品的表达量以相对于最低表达量的倍数进行分析。实验结果用平均值 ± 标准差（*SD*）表示，采用 SPSS 软件中 LSD 法进行多重比较，$P < 0.05$ 表示差异显著。死亡率数据在分析前先进行反正弦转换，后采用 SPSS 软件中 *t* 检验进行差异显著性分析，$P < 0.05$ 表示差异显著。

2　结果

2.1　飞蝗细胞色素 P450 基因的克隆及序列分析

以 P450 为关键词，搜索飞蝗转录组数据库，获得基因 cDNA 序列，搜索并通过 BlastX 比对分析，克隆验证飞蝗 CYP450 基因的全长 cDNA 序列，命名为 *LmCYP6FD3*（GenBank 登录号：KT316378）。*LmCYP6FD3* cDNA 全长 1 563 bp，编码 521 个氨基酸。*LmCYP6FD3* 氨基酸序列中包含昆虫 P450 基因共有序列，即血红素结合区序列 FXXGXXXCXG、C 螺旋序列 WXXXR、K 螺旋序列 EXXRXXP 、I 螺旋 A/GGXD/ETT/S 及“Meander”区域序列 PXXFXPXXF（图 1）及 CYP6 家族特征序列 EXXR。

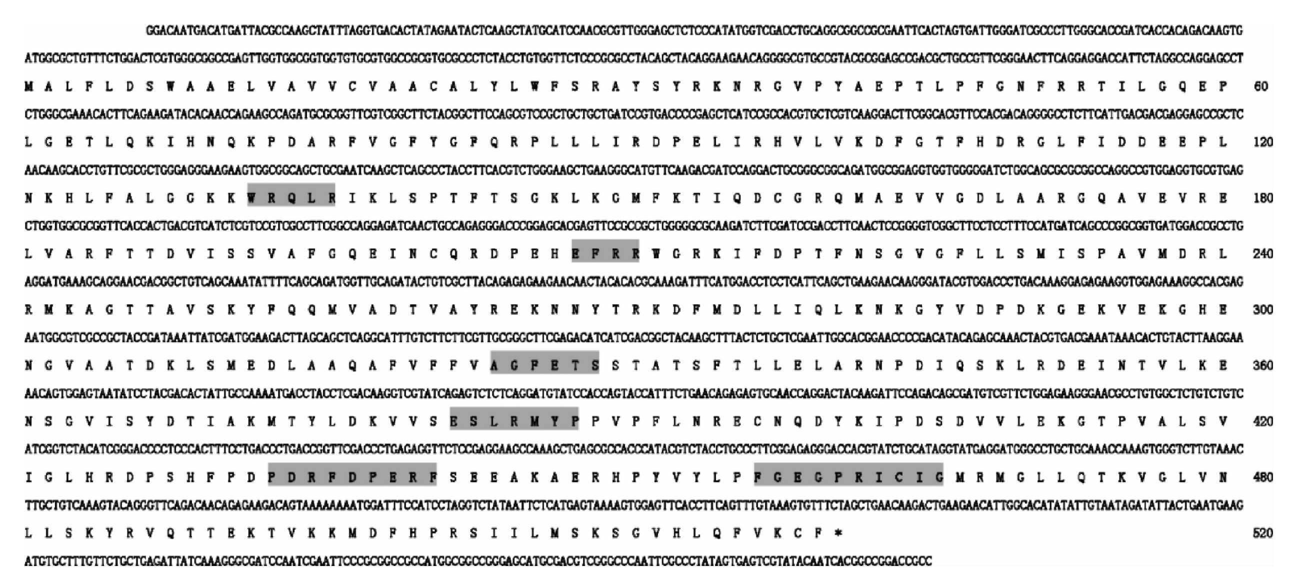


图 1　飞蝗 *CYP6FD3* cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　The cDNA and deduced amino acid sequences of *LmCYP6FD3* from *Locusta migratoria*

血红素结合位点 FXXGXXXCXG，C 螺旋 WXXXR，K 螺旋 EXXRXXP，I 螺旋 A/GGXD/ETT/S 和“Meander”区 PXXFXPXXF 用灰色标出。The heme signature regions FXXGXXXCXG, Helix C（WXXXR）, Helix K（EXXRXXP）, Helix I（A/GGXD/ETT/S）and ‘Meander’（PXXFXPXXF）are highlighted in grey.

2.2　*LmCYP6FD3* 在飞蝗不同发育阶段及 5 龄若虫不同组织中的表达特性

RT-qPCR 结果表明，*LmCYP6FD3* 在飞蝗整个发育阶段均有表达，其中在 1 龄若虫中的表达量最高（图 2）。*LmCYP6FD3* 在飞蝗 5 龄若虫前肠、胃盲囊、中肠、后肠、马氏管、脂肪体、体壁、精巢、卵巢、肌

肉和血淋巴 11 个组织中均有不同程度的表达，在马氏管中的表达量最高，其次是后肠和脂肪体，在血淋巴中的表达量最低（图 3）。

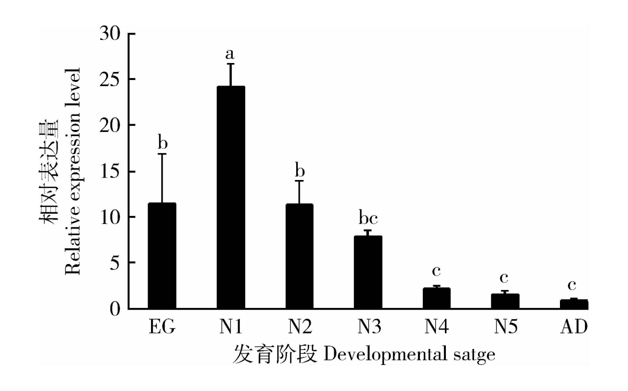


图 2　*LmCYP6FD3* 在飞蝗不同发育阶段的表达

Fig. 2　Expression of *LmCYP6FD3* in different developmental stages of *Locusta migratoria*

EG：卵 Egg；N1-N5：分别是 1-5 龄若虫 1st-5th instar nymph, respectively；AD：成虫 Adult. 每个处理 3 个重复，图中数据为平均值 ± 标准差；柱上不同字母表示差异显著（$P<0.05$，LSD 法）。Each treatment includes three replicates. The data are denoted as mean ± *SD*. Different letters above bars represent significant difference（$P<0.05$, LSD test）.

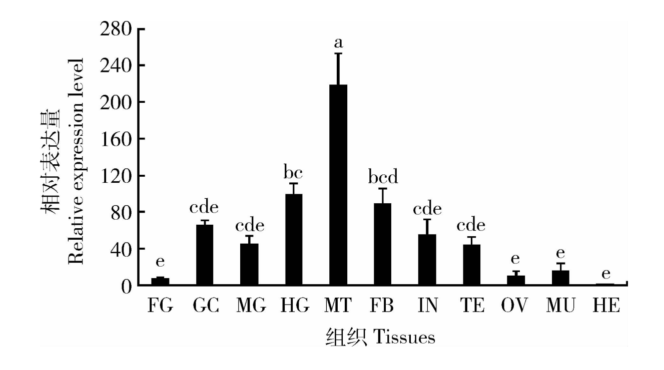


图 3　*LmCYP6FD3* 在飞蝗 5 龄若虫不同组织中的表达量

Fig. 3　Expression levels of *LmCYP6FD3* in different tissues of the 5th instar nymphs of *Locusta migratoria*

FG：前肠 Foregut；GC：胃盲囊 Gastric caeca；MG：中肠 Midgut；HG：后肠 Hindgut；MT：马氏管 Malpighian tubules；FB：脂肪体 Fat body；IN：体壁 Integument；TE：精巢 Testis；OV：卵巢 Ovary；MU：肌肉 Muscle；HE：血淋巴 Hemolymph. 每个处理 3 个重复，图中数据为平均值 ± 标准差；柱上不同字母表示差异显著（$P<0.05$，LSD 法）。Each treatment includes three replicates. The data in the figure are denoted as mean ± *SD*. Different letters above bars represent significant difference（$P<0.05$, LSD test）.

2.3　*LmCYP6FD3* 沉默效率检测

利用 RNAi 技术将飞蝗 2 龄若虫中 *LmCYP6FD3* 沉默后，采用 RT-qPCR 方法对不同时间点（12, 24 和 48 h）*LmCYP6FD3* mRNA 相对表达量进行测定。结果表明，与对照组相比，12, 24 和 48 h 的沉默效率分别为 79.49%，88.22% 和 67.80%。其中，*LmCYP6FD3* 在 24 h 的沉默效率最高（图 4）。

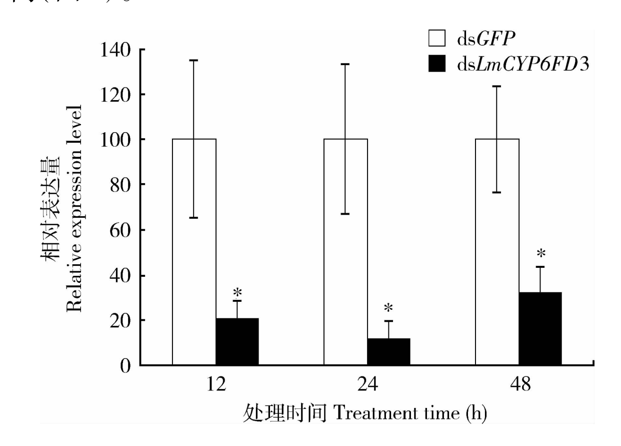


图 4　RNAi 对飞蝗 2 龄若虫中 *LmCYP6FD3* 基因沉默效率

Fig. 4　Silence efficiency of *LmCYP6FD3* in the 2nd instar nymphs of *Locusta migratoria* by RNAi

图中数据为平均值 ± 标准差；星号表示 RNAi 处理组（注射 ds*LmCYP6FD3*）和对照组（注射 ds*GFP*）之间有显著性差异（$P<0.05$，*t* 检验）。The data in the figure are mean ± *SD*. The asterisk indicates significant difference between the RNAi treatment group（injection with ds*LmCYP6FD3*）and the control group（injection with ds*GFP*）（$P<0.05$, *t*-test）.

2.4　*LmCYP6FD3* 沉默后飞蝗对杀虫剂的敏感性

通过 RNAi 技术结合生物测定实验，检测飞蝗对 3 种不同类型杀虫剂的敏感性，研究飞蝗 *LmCYP6FD3* 对杀虫剂的代谢解毒作用。结果表明，注射 ds*LmCYP6FD3* 的处理组与对照组（注射 ds*GFP*）相比，点滴马拉硫磷和溴氰菊酯后，飞蝗死亡率均无显著差异；而点滴西维因后，注射 ds*LmCYP6FD3* 的处理组的死亡率达到 57.78%，与对照组死亡率（27.77%）相比，提高了 32%，差异显著（$P<0.05$）（图 5）。

3　讨论与结论

对 CYP450 基因按照氨基酸序列相似度进行分类，其中同一家族的细胞色素 P450 基因氨基酸序列一致性大于 40%（Nebert *et al.*, 1987），同一亚家族的细胞色素 P450 基因其氨基酸序列一致性大于 55%（Nelson *et al.*, 1996）。本研究基于飞蝗转录组数据库，克隆获得一条细胞色素 P450 基因的 cDNA 全长序列，该基因被 CYP450 国际命名委员会命名为 *LmCYP6FD3*，归属于 CYP3 簇中的 CYP6 基因

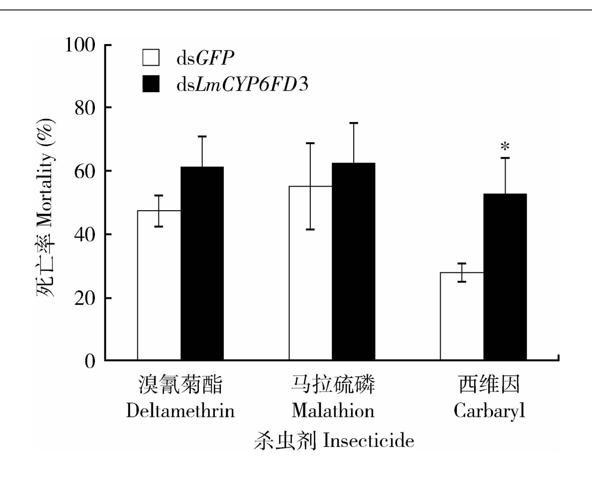


图 5　*LmCYP6FD3* 基因沉默后飞蝗若虫对杀虫剂的敏感性

Fig. 5　Susceptibility of *Locusta migratoria* nymphs to insecticides after injection of ds*LmCYP6FD3*

供试飞蝗 2 龄若虫分别注射 2 μL ds*CYP6FD3*（RNAi 处理）和 ds*GFP*（对照组），12 h 后分别点滴 3 μL 不同类型杀虫剂，24 h 后观察虫体的死亡率。图中数值为平均值 ± 标准误（n = 3）；星号表示 RNAi 处理组和对照组之间有显著性差异（$P < 0.05$，t 检验）。2 μL ds*CYP6FD3* (RNAi treatment) and ds*GFP* (control) were injected to the 2nd instar nymphs, respectively, and 12 h later the nymphs were exposed to 3 μL insecticides by dipping method. The mortality of the nymphs was assessed at 24 h post treatment. Data in the figure are mean ± *SE* (n = 3). The asterisk indicates significant difference between the RNAi treatment groups and controls ($P < 0.05$, *t*-test).

家族。

基因在不同发育阶段和组织中的表达特性在一定程度上可以反映基因的功能。为深入了解 *LmCYP6FD3* 分子特性及功能，本研究采用 RT-qPCR 方法检测 *LmCYP6FD3* 在飞蝗不同发育阶段以及不同组织中的表达情况。结果表明，*LmCYP6FD3* 在飞蝗卵期、若虫期和成虫期均有表达，其表达量随着发育龄期的增加呈现先升高后降低的趋势，到成虫期降至最低。本研究中飞蝗 *LmCYP6FD3* 在不同发育阶段的表达与烟草天蛾 *Manduca sexta CYP4M3* 相似，其 mRNA 表达水平在大量取食的幼虫期显著高于其他时期（Snyder *et al.*, 1995）。家蚕 *Bombyx mori CYP6AB5* 在低龄幼虫期的表达量显著高于卵期和成虫期，该基因被证明与氯氰菊酯的抗性有关（Li *et al.*, 2014）。据此推测，飞蝗在由若虫生长发育至成虫的过程中需不断地适应变化多端的外界环境，包括接触杀虫剂及其他有毒物质。细胞色素 P450 基因在此阶段的高表达，是由于虫体需通过上调细胞色素 P450 的表达量，以满足旺盛的生理代谢需要以及对杀虫剂等外源物质的代谢解毒。与其他昆虫类似，飞蝗细胞色素 P450 基因主要在脂肪体、马氏管和中肠等组织中表达量较高（Guo *et al.*, 2016）。本研究对 *LmCYP6FD3* 在飞蝗不同组织中的表达情况进行检测分析，发现其在飞蝗马氏管中表达量最高，后肠和脂肪体中表达量次之。由于马氏管是昆虫的主要排泄器官，其位于虫体的中、后肠交界处，可收集体腔中的代谢废物，通过后肠排出体外，对外源物质的代谢解毒起着重要作用（Yang *et al.*, 2007），本研究中飞蝗 *LmCYP6FD3* 基因在马氏管中的高表达，也显示出该基因在外源物质解毒过程中发挥重要功能。本研究中该基因在后肠中具有较高的表达量，也与马氏管中的代谢废物经由后肠排出有关。昆虫脂肪体的功能主要是储存能量以及对外界有毒物质的代谢解毒（Hou *et al.*, 2010），因此本研究中 *LmCYP6FD3* 在脂肪体中的高表达显示该基因与外源物质的解毒具有密切的关系。

RNA 干扰（RNAi）是研究昆虫基因功能的有效工具，将目的基因沉默后，昆虫对杀虫剂抗性显著降低，表明该基因编码的蛋白可能参与了此杀虫剂在昆虫体中的代谢解毒（Zhang *et al.*, 2013）。有研究报道，*CYP6AY1* 和 *CYP6BR1* 均与褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 对吡虫啉的抗性相关，采用 RNAi 技术及蛋白体外重组表达，证明褐飞虱 *CYP6AY1* 可以有效代谢吡虫啉，而 *CYP6BR1* 可以被吡虫啉显著诱导（Bao *et al.*, 2016）。利用 RNAi 技术研究赤拟谷盗 *Tribolium castaneum CYP6BQ9* 功能时发现，其被溴氰菊酯诱导后可超表达 200 倍，在细胞中的重组表达产物可有效地将溴氰菊酯代谢为 4-羟基溴氰菊酯（Zhu *et al.*, 2010）。笔者实验室利用 RNAi 技术研究发现，飞蝗谷胱甘肽硫转移酶（LmGST）（Qin *et al.*, 2011）、羧酸酯酶（LmCes）（Zhang *et al.*, 2013）和细胞色素 P450（LmCYP）（Guo *et al.*, 2015）分别参与了不同杀虫剂的解毒，其中 *LmCYP408B1*, *LmCYP409A1*, *LmCYP9A3* 和 *LmCYP9AQ2* 与溴氰菊酯的解毒有一定相关性（Guo *et al.*, 2015；Zhu *et al.*, 2016）。本研究采用 RNAi 技术干扰 *LmCYP6FD3* 基因，沉默效率可达 67.80% ~ 88.22%，并可持续至 48 h。之后结合杀虫剂生物测定，研究了 *LmCYP6FD3* 与拟除虫菊酯类杀虫剂溴氰菊酯、有机磷类杀虫剂马拉硫磷和氨基甲酸酯类杀虫剂西维因之间的解毒关系。研究发现沉默 *LmCYP6FD3* 后，飞蝗对马拉硫磷和溴氰菊酯的敏感性没有变化，而对西维因的敏感性增加（死亡率提高 32%），推测其可能参与飞蝗对西维因的体内解

毒代谢。已有研究表明,昆虫解毒酶系都是通过增强对杀虫剂的转化和降解作用以降低杀虫剂毒性,其中细胞色素 P450 酶系通过氧化、还原、水解及基团转移等方式代谢杀虫剂,在有机氯类、有机磷类、拟除虫菊酯类以及氨基甲酸酯类等多种杀虫剂中起着重要的代谢解毒作用。由于不同类型的杀虫剂化学结构及靶标位点存在差异,P450 催化发生的反应类型也有所不同(郭艳琼, 2012)。飞蝗体内与马拉硫磷抗性相关的解毒酶主要是酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶(杨美玲, 2008),溴氰菊酯可被细胞色素 P450 代谢为 4-羟基溴氰菊酯,而 *LmCYP6F* 亚家族已被证明与西维因代谢解毒相关(Guo *et al*., 2016)。西维因是带有萘的氨基甲酸酯,萘可以被氧化形成一个环氧化的中间产物,然后通过重排形成 1-萘酚(郭艳琼, 2012)。推测本研究中飞蝗 *LmCYP6FD*3 可以促使西维因化学结构上的萘氧化,萘环上发生羟基化反应,从而参与西维因在飞蝗体内的解毒。

综上所述,本研究从飞蝗转录组中搜索,并经 RT-PCR 技术克隆获得飞蝗细胞色素 P450 新基因 *LmCYP6FD*3 的 cDNA 全长序列。基因表达分析研究结果发现,*LmCYP6FD*3 在飞蝗后肠、马氏管和脂肪体中表达较高,表明其可能参与飞蝗对外源物质的代谢解毒。*LmCYP6FD*3 的杀虫剂敏感性实验结果表明,*LmCYP6FD*3 被沉默后,飞蝗对西维因的敏感性与对照组相比显著提高,表明 *LmCYP6FD*3 可能参与了西维因的飞蝗体内代谢解毒。本研究结果可为揭示飞蝗细胞色素 P450 基因的分子功能提供科学依据。

参考文献(References)

Baldwin WS, Marko PB, Nelson DR, 2009. The cytochrome P450 (CYP) gene superfamily in *Daphnia pulex*. *BMC Genomics*, 10 (1): 169.

Bao HB, Gao HL, Zhang YX, Fan DZ, Fang JC, Liu ZW, 2016. The roles of *CYP6AY*1 and *CYP6ER*1 in imidacloprid resistance in the brown planthopper: expression levels and detoxification efficiency. *Pestic. Biochem. Physiol*., 129: 70 – 74.

Bautista MA, Miyata T, Miura K, Tanaka T, 2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, *CYP6BG*1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 39(1): 38 – 46.

Cohen MB, Schuler MA, Berenbaum MR, 1992. A host-inducible cytochrome P-450 from a host-specific caterpillar: molecular cloning and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (22): 10920 – 10924.

David P, Dauphin-Villemant C, Mesneau A, Meyran JC, 2003. Molecular approach to aquatic environmental bioreporting: differential response to environmental inducers of cytochrome P450 monooxygenase genes in the detritivorous subalpine planktonic Crustacea, *Daphnia pulex*. *Mol. Ecol*., 12(9): 2473 – 2481.

Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol*., 44: 507 – 533.

Fogleman JC, Danielson PB, 2000. Analysis of fragment homology among DNA sequences from cytochrome P450 families 4 and 6. *Genetica*, 110(3): 257 – 265.

Guo YQ, 2012. Molecular Characterizations and Their Functions of Cytochrome P450s in *Locusta migratoria*. PhD Dissertation, Shanxi University, Taiyuan. 10 – 13. [郭艳琼, 2012. 飞蝗细胞色素 P450 基因的分子特性及功能研究. 太原: 山西大学博士学位论文. 10 – 13]

Guo YQ, Wu HH, Zhang XY, Ma EB, Guo YP, Zhu KY, Zhang JZ, 2016. RNA interference of cytochrome P450 CYP6F subfamily genes affects susceptibility to different insecticides in *Locusta migratoria*. *Pest Manag. Sci*., 72(11): 2154 – 2165.

Guo YQ, Zhang JZ, Zhu KY, Guo YP, Ma EB, 2012. Identification of two new cytochrome P450 genes and RNA interference to evaluate their roles in detoxification of commonly used insecticides in *Locusta migratoria*. *Chemosphere*, 87(7): 709 – 717.

Guo YQ, Zhang XY, Wu HH, Yu RR, Zhang JZ, Zhu KY, Guo YP, Ma EB, 2015. Identification and functional analysis of a cytochrome P450 gene *CYP9AQ*2 involved in deltamethrin detoxification from *Locusta migratoria*. *Pestic. Biochem. Physiol*., 122: 1 – 7.

He YP, Ma EB, Zhu KY, 2004. Characterizations of general esterases in relation to malathion susceptibility in two field populations of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Pestic. Biochem. Physiol*., 78(2): 103 – 113.

Hou Y, Zou Y, Wang F, Gong J, Zhong X, Xia Q, Zhao P, 2010. Comparative analysis of proteome maps of silkworm hemolymph during different developmental stages. *Proteome Sci*., 8(1): 45.

Li B, Zhang H, Ni M, Wang BB, Li FC, Xu KZ, Shen WD, Xia QY, Zhao P, 2014. Identification and characterization of six cytochrome P450 genes belonging to CYP4 and CYP6 gene families in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Rep*., 41(8): 5135 – 5146.

Liu X J, Li F, Li DQ, Ma EB, Zhang WQ, Zhu KY, Zhang JZ, 2013. Molecular and functional analysis of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases from the migratory locust, *Locusta migratoria*. *PLoS ONE*, 8(8): e71970.

Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR, 1987. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*, 6(1): 1.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW, 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1): 1 – 42.

Qin GH, Jia M, Liu T, Xuan T, Zhu KY, Guo YP, Ma EB, Zhang JZ,

2011. Identification and characterisation of ten glutathione S-transferase genes from oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Pest Manag. Sci.*, 67(6): 697-704.

Ren BZ, Zhang X, 2013. History and controlling strategy of locust plague in China. *J. Jilin Agric. Univ.*, 35(2): 127-131. [任炳忠, 张雪, 2013. 中国的蝗灾及防控对策. 吉林农业大学学报, 35(2): 127-131]

Ren XY, Yang ML, Gao CE, Zhang JZ, Ma EB, 2014. Molecular characteristics and functional analysis of three cytochrome P450 genes in *Locusta migratoria*. *Sci. Agric. Sin.*, 47(10): 1956-1965. [任晓宇, 杨美玲, 高翠娥, 张建珍, 马恩波, 2014. 飞蝗 3 个细胞色素 P450 基因的分子特性及功能. 中国农业科学, 47(10): 1956-1965]

Snyder MJ, Stevens JL, Andersen JF, Feyereisen R, 1995. Expression of cytochrome P450 genes of the CYP4, family in midgut and fat body of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 321(1): 13-20.

Werck-Reichhart D, Feyereisen, 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.*, 1: 3003.1-3003.9.

Yang J, McCart C, Woods DJ, Terhzaz S, Greenwood KG, ffrench-Constant RH, Dow JA, 2007. A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiol. Genomics*, 30(3): 223-231.

Yang ML, 2008. Organophosphorus Resistance Mechanisms of Oriental Migratory Locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). PhD Dissertation, Shanxi University, Taiyuan. 53-54. [杨美玲, 2008. 东亚飞蝗对有机磷杀虫剂的抗性及其机理研究. 太原: 山西大学博士学位论文. 53-54]

Yang ML, Zhang JZ, Zhu KY, Xuan T, Liu X J, Guo YP, Ma EB, 2008. Increased activity and reduced sensitivity of acetylcholinesterase associated with malathion resistance in a field population of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 91(1): 32-38.

Yang ML, Zhang JZ, Zhu KY, Xuan T, Liu XJ, Guo YP, Ma EB, 2009. Mechanisms of organophosphate resistance in a field population of oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 71(1): 3-15.

Zhang JQ, Li DQ, Ge PT, Yang ML, Guo YP, Zhu KY, Ma EB, Zhang JZ, 2013. RNA interference revealed the roles of two carboxylesterase genes in insecticide detoxification in *Locusta migratoria*. *Chemosphere*, 93(6): 1207-1215.

Zhu F, Parthasarathy R, Bai H, Woithe K, Kaussmann M, Nauen R, Harrison DA, Palli SR, 2010. A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(19): 8557-8562.

Zhu WY, Yu RR, Wu HH, Zhang XY, Liu YM, Zhu KY, Zhang JZ, Ma EB, 2016. Identification and characterization of two *CYP9A* genes associated with pyrethroid detoxification in *Locusta migratoria*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 132: 65-71.

（责任编辑：马丽萍）